

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A01K 67/027, C12N 5/06, 5/10</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/35906</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 22. Juli 1999 (22.07.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/00229 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 16. Januar 1998 (16.01.98)  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> AGROBIOGEN GMBH [DE/DE]; Thalmannsdorf 25, Larezhhausen, D-86567 Hilgertshausen (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BREM, Gottfried [DE/DE]; Agrobiogen GmbH, Thalmannsdorf 25, Larezhhausen, D-86567 Hilgertshausen (DE). DURCOVA-HILLS, Gabriela [SK/DE]; Bayr. Forschungszentrum für Reproduktionsbiologie (BFZF), Hackerstrasse 27, D-85764 Oberschleißheim (DE). MÜLLER, Sigrid [DE/AT]; Institut für Tierzucht und Genetik, Österreich, Joseph-Baumann-Gasse 1, A-1210 Wien (AT). SCHERN- THANER, Wolfgang [AT/DE]; Bayr. Forschungszentrum für Reproduktionsbiologie (BFZF), Hackerstrasse 27, D-85764 Oberschleißheim (DE). WENIGERKIND, Hendrik [DE/AT]; Institut für Tierzucht und Genetik, Österreich, Joseph-Baumann-Gasse 1, A-1210 Wien (AT). WOLF, Eckhard [DE/AT]; Institut für Tierzucht und Genetik, Österreich, Joseph-Baumann-Gasse 1, A-1210 Wien (AT). ZAKHARTCHENKO, Valeri [RU/DE]; Bayr. Forschungszentrum für Reproduktionsbiologie (BFZF), Hackerstrasse 27, D-85764 Oberschleißheim (DE).	<b>(74) Anwalt:</b> STRAUS, Alexander; Kirschner & Kurig, Sollner Strasse 38, D-81479 München (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<b>(54) Title:</b> EFFICIENT NUCLEAR TRANSFER USING PRIMORDIAL GERM CELLS <b>(54) Bezeichnung:</b> EFFIZIENTER KERNTRANSFER MIT PRIMORDIALEN KEIMZELLEN <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for rearing animals by means of cloning and to the animals obtained using said method. The invention especially relates to a method for reproducing animal embryos via an efficient nuclear transfer using primordial germ cells.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von Tieren über Klonierung sowie die mit dem Verfahren erhältlichen Tiere, insbesondere ein Verfahren zur Wiederherstellung tierischer Embryonen über einen effizienten Kerntransfer mit primordialen Keimzellen.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Effizienter Kerntransfer mit primordialen Keimzellen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von Tieren über Klonierung sowie die mit dem Verfahren erhältlichen Tiere. Diese Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zum Klonieren von Tieren über einen effizienten Kerntransfer mit bestimmten fetalen Zellen.
- 10 Tiere, insbesondere Nutztiere, werden vom Menschen seit langem für die verschiedensten Zwecke weitergezüchtet und im Hinblick auf bestimmte Eigenschaften fortentwickelt. So wurden beispielsweise Kühe und Stiere mit hohem Zuchtwert für Milchleistung weiterverpaart, um Tiere mit hohem Milchertrag zu erhalten.
- 15 In den letzten Jahren gerieten Tiere, insbesondere Vertreter der Ungulaten, wie Schafe, Rinder bzw. Kühe auch als Produktionsstätten ernährungsphysiologisch bzw. pharmazeutisch bedeutender Stoffe in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses, da es mit der Entwicklung der Gentechnologie möglich wurde gezielt Tiere herzustellen, denen eine neue Eigenschaft, beispielsweise die Fähigkeit zur Produktion eines bestimmten Arznei-
- 20 mittels, verliehen werden konnte. Das Problem bei der wirtschaftlichen Nutzung derartiger Tiere besteht jedoch darin, daß das ihnen transferierte Genkonstrukt integriert und stabil an die Nachkommen weitergegeben wird.
- Zu diesem Zweck wurde versucht, das Problem des Gentransfers dadurch zu lösen, daß
- 25 dieser in Zellen vorgenommen wird, wobei aus diesen Zellen mittels Klonierung wieder Tiere generiert werden.
- In der Fachwelt wird der Begriff des "Klonierens" allgemeinen als Vervielfältigung eines genetischen Materials, abgeleitet von einer einzigen Zelle definiert, was übertragen auf die
- 30 Embryologie als Erstellung von Embryonen bzw. Tieren mit identischem Genotyp verstanden werden kann. In der Embryologie wird der Keimling während der Blastogenese, also bis zur Entwicklung der Anlage von Primitivorganen als Embryo, in den nachfolgenden Entwicklungsstufen als Fetus bezeichnet. Embryonale Phasen verlaufen je nach Spezies in unterschiedlich langen Zeiträumen ab, so beispielsweise beim Rind in einem
- 35 Zeitraum von etwa 4 Wochen, wobei bei anderen Spezies innerhalb der Ungulaten kürzere oder auch längere Zeiträume dafür erforderlich sein können.

Zur Klonierung von Tieren, also zur Vervielfältigung eines einem bestimmten Tier eigenen Genotyps wurden bis dato mehrere Wege beschritten.

- 5 Einerseits wurden frühe Embryonalstadien und Fortentwicklungen einem mikrochirurgischen Eingriff unterworfen und die jeweils daraus isolierten Teile wurden in vitro bzw. in vivo weitergezüchtet.

- 10 Weiter wurde eine als "Chimäres Klonen" bezeichnete mikromanipulatorische Kombination asynchroner Entwicklungsstadien durchgeführt, bei der Blastomere(n) aus Embryonen weiter fortgeschrittener Stadien mit Blastomeren aus früheren Stadien zusammengebracht wurden, mit dem Ziel, die erstgenannten in ihrer Weiterentwicklungskapazität zu unterstützen und somit identische Viellinge zu erzeugen. Die größte Anzahl damit erhaltener Klone lag jedoch lediglich in einer Größenordnung von maximal 5-8.

- 15 Eine weitere Vorgehensweise war die parthenogenetische Aktivierung oder die Verpaarung homozygoter Elterntiere, um hinsichtlich bestimmter Eigenschaften Klone zu erhalten.

- 20 Da sich die oben genannten Verfahren hinsichtlich Ihrer Effektivität und Zuverlässigkeit jedoch als relativ schlecht erwiesen, wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, das generell als Kernttransfer bezeichnet wird.

- 25 Dabei werden Zellkerne, die von mehrzelligen Embryonen stammen, in entsprechend vorbereitete Eizellen überführt, wobei genetisch identische Embryonen erstellt werden konnten.

Um eine Klonierung mittels Kernttransfer erfolgreich durchführen zu können, müssen jedoch einige unabdingbare Parameter berücksichtigt werden.

- 30 Die Eizelle, die als Empfängerzelle eingesetzt wird, muß das Metaphase-Stadium in der 2. Reifeteilung (Metaphase II) vollendet haben und soll keine eigene nukleare DNA mehr enthalten, d.h. sie soll als sogenannte enukleierte Eizelle vorliegen. Des weiteren sollte das Cytoplasma der Eizelle so wenig wie möglich beeinflusst werden, da die in dem Cytoplasma selbst enthaltenen Stoffe für die Weiterentwicklung, beispielsweise die  
35 Teilung der Zelle, von Bedeutung sein können.

Weiterhin muß die nukleare DNA des übertragenen Kerns reprogrammiert werden. Da der (Spender-) Kern von einem mehrzelligen Embryo stammt, hat die jeweilige Spenderzelle

bereits einige Teilungszyklen durchlaufen. Dies bedeutet, daß sich die Zelle in einem gegenüber einer totipotenten befruchteten Eizelle fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befindet, in dem möglicherweise bereits bestimmte, für die frühe Entwicklung erforderliche Gene abgeschaltet sind.

5

Aus diesem Grund muß die verwendete Kern-DNA derart reprogrammiert werden, daß die vollständige genetische Information der Kern-DNA wieder zur Verfügung steht und das Teilungsschema des Embryos wieder beim Stadium der Zygote beginnt. Je besser somit diese Reprogrammierung bzw. Aktivierung erreicht werden kann, desto höher liegt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Klonierung, mit der dann auch ein fertig entwickeltes, d.h. lebend geborenes geklontes Tier erhalten werden kann.

10 Neben der Kern-DNA ist u.a. auch die in dem Cytoplasma vorhandene mRNA von Bedeutung, da diese im Zeitpunkt der Vereinigung von Eizelle und Spenderzelle die für das gegenwärtige Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstadium der Spenderzelle erforderlichen Botschaften darstellt und die damit hergestellten Proteine einen Einfluß auf die weitere Entwicklung der Zelle nehmen können.

20 Das Verfahren des Kerntransfers wurde bereits mit bescheidenem Erfolg eingesetzt. So berichteten Willadsen et al. (*Nature* **320** (1986), 63-65) über die Klonierung von Lämmern, wobei die Kerne aus Kern-Spenderzellen aus dem 8-Zell-Stadium stammten. Robl et al. (*J. Anim. Sci.* **64** (1987), 642-647) berichteten über die ersten Kerntransferexperimente beim Rind, wobei ausschließlich mit ex vivo gewonnenen Rinderembryonen als Kernspender gearbeitet wurde. Bei diesen Versuchen war immer eine in vivo Zwischenkultur in Schafeileitern erforderlich. In den folgenden Jahren konnte auch gezeigt werden, daß das Embryonalklonen beim Rind rein in vitro, also unter Verwendung von in vitro produzierten Embryonen und in vitro gereiften Eizellen, erfolgreich durchgeführt werden kann (Sims et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1991), 6143-6147).

25 30 In der WO 97/07668 wird weiter ein Verfahren zur Wiederherstellung eines tierischen Embryos beschrieben, bei dem generell ein Kern mit einem diploiden Chromosomensatz in eine enukleierte Eizelle überführt wird, die in dem Metaphasenstadium II gehalten wird, wobei die Eizelle beim Einbringen des Kerns erst nach einer gewissen Zeit aktiviert wird. Durch später erfolgende Aktivierung der Eizelle nach Einbringen der Kern-DNA soll eine verbesserte Reprogrammierung der eingebrachten Kern-DNA erreicht werden.

35

Die WO 96/07732 beschreibt ebenfalls ein Verfahren zur Wiederherstellung eines tierischen Embryos, bei dem Zellen aus der Keimscheibe eines Embryos im Blastozysten-

Stadium isoliert, in einer geeigneten Umgebung reifen gelassen und deren Kerne dann in geeignete Zellen eingebracht werden.

5 Ein Problem bei dieser Technologie besteht jedoch immer noch darin, geeignete Spender-  
Zellen für den Kerntransfer zu finden, mit der sich ein tierischer Embryo am zweck-  
mäßigsten und wirtschaftlichsten herstellen läßt. Bekanntermaßen stellt die Re-  
programmierung der Kern-DNA aus der jeweils gewählten Spenderzelle die größte  
Schwierigkeit bei der Embryoklonierung dar, da diese nicht nur Einfluß hat auf die weitere  
10 frühe Reifung des Embryos, sondern auch auf die spätere Entwicklung nach einer gegebe-  
nenfalls durchgeführten Einpflanzung in ein Muttertier. So bestehen trotz aller Erfolge auf  
diesem Gebiet immer noch Probleme hinsichtlich einer effektiven Reprogrammierung der  
Spender-Kern-DNA, um die manipulierte Eizelle mit neuem Kern dem Zustand einer  
natürlichen Zygote anzunähern. Dies drückt sich u.a. in einer äußerst geringen Ausbeute  
hinsichtlich der Gewinnung embryonaler Blastozysten und einer geringen Teilungsrate aus.

15 Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, die Nachteile des Standes  
der Technik zu überwinden und eine geeignete Kern-Spenderzelle zur Verfügung zu  
stellen, mit der ein verbessertes Verfahren zum Klonieren von Tieren bereitgestellt werden  
kann.

20 Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Klonieren eines tierischen Embryos,  
bei dem als Spenderzelle für den Kerntransfer primordiale Keimzellen eingesetzt werden.  
Der Kern dieser Zelle wird mit einer geeigneten Empfängerzelle zusammengebracht und  
die so erhaltene Zelle wird für einen Zeitraum gezüchtet, damit sich eine Blastozyste  
25 bildet. Die daraus erhältliche Blastozyste kann dann gegebenenfalls zum Austragen in ein  
Muttertier eingebracht werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Empfänger-  
zelle eine enukleierte Eizelle, in die der Kern der primordialen Keimzelle zum Kern-  
30 transfer eingebracht werden kann oder mit der die primordiale Keimzelle selbst fusioniert  
wird. Die primordiale Keimzelle kann dabei aus einem Fetus und direkt oder nach  
längerem Züchten verwendet werden.

Die Tiere, bei denen das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann, sind bei-  
35 spielsweise Ungulaten, Kaninchen, Nager, oder Vögel, wobei Ungulaten, insbesondere  
Schweine, Schafe, Ziegen, Rinder bzw. Kühe bevorzugt sind.

- In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in dem Verfahren eingesetzten primordialen Keimzellen transgen, d.h. sie enthalten ein oder mehrere Gene, die entweder von einer exogenen Quelle abgeleitet sind oder die ein endogenes, an einen anderen, nicht natürlichen Locus im Genom eingebrachtes Gen darstellen. Diese Gene codieren vorzugsweise für ein Arzneimittel, beispielsweise einen Antikörper oder einen ernährungsphysiologisch interessanten Stoff, beispielsweise Chymosin oder Trypsin, wobei die Gene jeweils unter der Kontrolle eines oder des endogenen oder eines exogenen Promotors liegen können.
- 5
- 10 Zur Gewinnung primordialer Keimzellen werden Feten aus graviden Tieren gewonnen, beispielsweise durch Absaugen aus dem Fetus. Die aus dem Fetus gewonnenen Zellen werden sodann auf die gewünschten primordialen Keimzellen selektiert, wie beispielsweise durch Anhaftenlassen von vorhandenen Fibroblasten an das Kulturgefäß, Wachsenlassen der Keimzellen auf geeigneten Feederzellen oder mechanische Selektion mittels einer
- 15 Pipette. Primordiale Keimzellen lassen sich aufgrund ihres Phänotyps von anderen Zellen unterscheiden, da sie sich als leicht gelblich aussehende, irregulär oder rund geformte Zellen mit großem Kern identifizieren lassen, die gegebenenfalls "Blebbing"-Phänomene zeigen. Damit können dann die gewünschten primordialen Zellen isoliert werden.
- 20 Für die nachfolgenden Schritte kann die gewonnene primordiale Keimzelle als solche eingesetzt werden, oder der Kern kann daraus isoliert und weiterverwendet werden.
- Als Empfängerzellen werden in der Regel enukleierte Eizellen eingesetzt, die in vivo oder in vitro gereift sind. So können beispielsweise in vitro gereifte, unbefruchtete Eizellen eingesetzt werden, bei denen nach Erreichen der Metaphase II die umgebenden Cumuluszellen entfernt wurden.
- 25
- Die Empfängerzelle soll vorzugsweise keine eigene Kern-DNA aufweisen. Für die Entfernung der Eizell-DNA sind im Stand der Technik mehrere Möglichkeiten vorhanden, wie beispielsweise die Trennung der Eizelle in zwei Hälften, von denen eine Hälfte keinen Kern mehr aufweist und weiterverwendet werden kann, oder eine Bestrahlung mit ultravioletem Licht zur Zerstörung der zelleigenen DNA. Eine Entfernung des Kerns bzw. der Pro-Nuclei oder der Metaphasen-Platte mittels Mikromanipulation ist ebenfalls möglich. Als bevorzugt hat sich eine Behandlung der Eizellen vor der Mikromanipulation mit Cytochalasin B mit anschließendem Absaugen des in der Nähe des Polkörpers liegenden Zytoplasmas mit Hilfe einer Pipette, beispielsweise mit einem Leitz-Micromanipulator (Leica, Bensheim, Deutschland) geführt, erwiesen. Da die Kern-DNA der Eizelle zu diesem Zeitpunkt in der Nähe der Polkörperchen lokalisiert ist, ist die E nukleationsrate bei
- 30
- 35

dieser Methode sehr hoch, wobei gleichzeitig nur ein kleiner Teil des Cytoplasmas mit abgesaugt wird.

- 5 Nach Gewinnen der jeweils beim Kerntransfer beteiligten Zellen können generell zwei Wege beschritten werden. Der Kern der primordialen Keimzellen wird anhand im Stand der Technik bekannter und etablierter Verfahren isoliert und in die vorbereitete Empfängerzelle eingebracht, wie beispielsweise mittels Injektion oder die primordiale Keimzelle selbst wird mit der Empfängerzelle fusioniert.
- 10 Bei einer Fusion kann eine primordiale Keimzelle mit Hilfe einer geeigneten Vorrichtung, wie einer Transferpipette unter die Zona pellucida der enukleierten Eizelle geschoben und dort abgesetzt werden. Zur Integration des Zellkerns der primordialen Keimzelle in das Zellplasma der Eizelle wird die Membran der Fibroblast mit der Membran der Eizelle fusioniert. Techniken zur Fusion von Zellen sind im Stand der Technik wohlbekannt, bei-
- 15 spielsweise Fusion unter Verwendung des Sendai-Viruses, Behandlung mit PEG (Polyethylenglycol), Laserfusion oder Elektroschock. Die letztgenannte Methode, die sogenannte Elektrofusion, bei der durch gegebenenfalls mehrmalige, beispielsweise 2 bis 10 mal, kurzzeitige Gleichstrompulse von etwa 1 bis 5 kV/cm, vorzugsweise 1 bis 3 kV/cm, mit einer jeweiligen Dauer von 2 µsek. bis 1 sek., Poren induziert werden, die ein Zu-
- 20 sammenfließen des Zytoplasmas ermöglichen, ist in dem vorliegenden Verfahren bevorzugt, da die elektrischen Pulse bei geeigneter Stärke gleichzeitig eine Aktivierung der (fusionierten) Eizelle mit sich bringen können. Die Aktivierung kann auch einige Stunden (ca. 2-5 Std.) nach der Fusion erfolgen, beispielsweise durch eine Inkubation der fusionierten Zelle in einer 7 %igen Alkohollösung, vorzugsweise einer 7 %igen Ethanol-
- 25 lösung, oder anhand anderer im Stand der Technik bekannten Verfahren.

- Die Aktivierung der fusionierten Zelle ist ein wichtiger Schritt, da sie die Voraussetzung für das Ingangkommen der Teilungsaktivität des Fusionsproduktes ist. Nach erfolgter Fusion und Aktivierung werden die Keimzellen-Eizelle-Komplexe (Kerntransferembryonen) gezüchtet, bis sie ein Stadium erreichen, in dem sie gegebenenfalls auf einen Empfänger transferiert werden können. Dabei können dem verwendeten Kulturmedium
- 30 nach Wahl Stoffe zugesetzt werden, die die Aggregation von Mikrotubuli unterstützen oder inhibieren. Nocadazol sowie Colcemid sind Beispiele für die Aggregation inhibierende Mittel, Taxol ist ein Mikrotubuli-Stabilisator. Diese Stoffe verhindern eine gegebenenfalls auftretende Bildung mehrerer Pro-Nuclei.
- 35

Bei den bestehenden Verfahren des Standes der Technik mußten zur weiteren Züchtung der sich bildenden Embryos diese sorgfältig in einen Zwischenempfänger überführt werden.



Dies wurde im allgemeinen dadurch erreicht, daß der Embryo in einem schützenden Medium, wie Agar, verpackt in die Eileiter eines "einstweiligen Muttertiers" (temporärer Empfänger) überführt wurde, in dem eine weitere Entwicklung bis zur Einpflanzung in das (endgültige) Muttertier erforderlich war. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es  
5 jedoch auch möglich, bestehende in-vitro-Systeme für die Kultivierung einzusetzen, ohne dabei die Ausbeuten zu verschlechtern. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, könnte diese Tatsache mit der getroffenen Auswahl der Spenderzelle einhergehen, mit der Embryonen erhalten werden können, die hinsichtlich Ihrer Entwicklung natürlich erzeugten Embryonen sehr nahe kommen. Die Zellen werden für einen Zeitraum in Kultur  
10 gehalten, bis sich Blastozysten bilden. Dies umfaßt einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen, vorzugsweise 6 bis 7 Tagen.

Erfindungsgemäß ist es nun möglich klonierte Embryonen zu Feten heranwachsen zu lassen, die dann wieder als Kernspender herangezogen werden können. Im Rahmen dieser  
15 sogenannten Reklonierung kann die Zahl an klonierten Embryonen weiter erhöht werden.

Die primordialen Keimzellen zum Einsatz in dem erfindungsgemäßen Verfahren können aus einer Vielzahl von Tieren gewonnen werden, wie beispielsweise aus Säugern, Ungulaten, Kaninchen, Nagern, wie beispielsweise Ratten oder Mäusen, oder Vögeln, wie beispielsweise Enten, Gänsen oder Hühnern. Dabei sind u.a. im Hinblick auf wirtschaftliche Gesichtspunkte Ungulaten bevorzugt, wie beispielsweise Rinder, Schafe, Ziegen, Büffel, Kamele sowie Schweine. Am meisten bevorzugt sind Schafe bzw. Kühe.  
20

Um die Isolierung des Genprodukts zu erleichtern kann das Genprodukt in ein Produkt des Tieres selbst gerichtet werden, bei Kühen bzw. Schafen beispielsweise in die Milch oder bei Vögeln in die Eier. Dies kann durch Wahl geeigneter Promotoren zur organspezifischen Expression erreicht werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Das Genprodukt kann jedoch gleichermaßen aus dem Tier selbst gewonnen werden, beispielsweise aus dem Serum. Auch ist es möglich, daß das/die Organ(e)/Gewebe der Tiere das gewünschte Produkt darstellen, beispielsweise für eine (Xeno-)Transplantation.  
25  
30

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten primordialen Keimzellen bzw. die Feten oder Tiere, von denen sie abgeleitet sind, können darüber hinaus transgen sein, wobei das Transgen vorzugsweise für ein ernährungsphysiologisch oder pharmazeutisch  
35 interessantes Produkt, beispielsweise einen Antikörper codiert. Beispielsweise können bei Kühen oder Schafen die Gene für Chymosin oder Trypsin in ein Konstrukt eingebaut werden, das die Produktion des entsprechenden Enzyms, bzw. eines seiner Vorläufer in der Milch des Tieres ermöglicht. Das Transgen von Interesse kann dabei, je nach Wunsch, unter

der Steuerung eines exogenen, ebenfalls transgenen Promotors liegen, oder ein bekannter endogener Promotor kann für diesen Zweck eingesetzt werden.

- 5 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nun möglich, eine Verbesserung der Gewinnung homologer tierischer Proteine, eine Veränderung tierischer Produkte, wie Milch selbst oder die Gewinnung tierischer Organe für beispielsweise einen medizinischen Einsatz zu erreichen.

- 10 Eine ganze Reihe von Proteinen wird bislang aus tierischen Organen durch Aufreinigung aus diesen Organen gewonnen und dann in der Medizin oder Technik eingesetzt. Probleme dabei bestehen u.a. hinsichtlich der relativen Mengen, in denen sie in diesen Geweben vorhanden sind (beispielsweise FSH aus Hypophysen), was zu hohen Produktionskosten führt, da zur Gewinnung einerseits eine große Menge an Ausgangsmaterial, d.h. viele Tiere, erforderlich sind, was aufgrund der Vielzahl von Tieren die Gefahr einer Kontami-  
15 nation, mit beispielsweise Krankheitserregern, wie BSE oder Ehec, mit sich bringt.

- Beispiele für interessierende Proteine aus Tierorganen sind Aprotinin aus der Lunge, Chymosin aus dem Magen, Katalase aus der Leber, Elastase, Pankreatin, Insulin oder Trypsin aus dem Pankreas, Hyaluronidase aus Hoden, Chondroitin aus Trachea, Kollagene  
20 aus der Haut, Fibronectin oder Vitronectin aus Plasma, Epithelial Cell Growth suppl. oder LH (Luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse, Fibroblast growth factor oder Ganglioside aus dem Hirn, sowie Hämoglobin, Thrombin, Transferrin usw.. Diese Aufzählung ist nicht als Einschränkung anzusehen.

- 25 Für alle diese Produkte kann eine ektopische Expression, d.h. eine Expression in einem anderen Gewebe, beispielsweise in der Milchdrüse erreicht werden, wenn in den für die Klonierung verwendeten Zellen vorher entweder ein additiver Gentransfer durchgeführt wurde, beispielsweise über Injektion, Transformation, Transfektion oder anhand eines anderen im Stand der Technik bekannten Verfahrens, wobei ein in vitro rekombiniertes  
30 Genkonstrukt zusätzlich ins Genom integriert wird. Darüber hinaus kann durch homologe Rekombination in den Zellen erreicht werden, daß das endogen vorhandene Gen mit einem Promotor gekoppelt wird, der für dieses Strukturgen ein anderes Expressionsmuster ergibt, beispielsweise Produktion von Chymosin im Euter mit einhergehender Sezernierung in die Milch anstelle der endogenen Synthese im Magen. Weiter kann ein endogen vorhandener Promotor, beispielsweise der Casein- oder Lactoglobulin-Promotor mit einem neuen  
35 Strukturgen gekoppelt werden, so daß für die Expression optimale Bedingungen vorliegen. In beiden vorstehend aufgeführten Fällen können Promotor und Strukturgen, die homolog in das Genom hinein rekombiniert werden, vorab aus einer Genbank isoliert werden, die

beispielsweise aus primordialen Keimzellen gewonnen worden ist, so daß nicht nur spezieiseigene DNA (Selbstklonierung) eingesetzt wird, sondern es sich auch um isogene DNA handelt.

- 5 Auf diesem Weg kann daher die Zusammensetzung von Nahrungsmitteln, die aus tierischen Produkten, wie beispielsweise Milch gewonnen werden, in gewünschter Weise verändert werden, so daß diese positive alimentäre, dietätische, gesundheitsfördernde Eigenschaften oder ein geringeres allergenes Potential, bessere Lagerungsstabilität oder Verarbeitungseigenschaften aufweisen. So kann beispielsweise Milch mit Ehec-Anti-
- 10 körnern oder Milch mit speziell auf Erkrankungen, wie beispielsweise Laktoseintoleranz, abgestimmten Eigenschaften hergestellt werden.

Darüber hinaus können durch Verwendung von MACs (Mammalian artificial Chromosomes) Integrationsmutationen vermieden und große DNA-Fragmente transferiert werden.

- 15 Diese MACs werden als zusätzliche Mini- bzw. Mikrochromosomen im Kern genauso repliziert, wie die endogenen Chromosomen. Dadurch ist es beispielsweise möglich, über die Spezies hinweg Gencluster zu transferieren, beispielsweise komplette Immunglobulin-Gencluster des Menschen auf Nutztiere, wobei dieses Nutztier dann in der Lage wäre, humane Antikörper zu produzieren, die gewonnen und genutzt werden könnten. Der
- 20 Transfer bestimmter MACs aus der eigenen Spezies führt weiter dazu, daß bei additiven Geneffekten eine Erhöhung der Synthese des Genprodukts folgern würde.

- Wichtig ist auch eine Expression homologer Proteine bzw. auch von ggf. transgenen Geweben oder Organen in Nutztieren, bei Proteinen in den gleichen Organen, in denen
- 25 diese Proteine auch beim Menschen exprimiert werden. Die Proteine werden dann anhand im Stand der Technik bekannter Verfahren gewonnen, die Gewebe bzw. Organe vor einer eventuellen Transplantation aus dem Tier entnommen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in einer hohen Identität der exprimierten Proteine, da sie im richtigen Organ prozessiert bzw. post-translational modifiziert werden, beispielsweise Expression von
- 30 Erythropoietin in der Niere. Die führt dazu, daß die aus den unterschiedlichen Geweben gewonnenen Proteine die gleiche Glycosylierung aufweisen, wie die Stoffe im Menschen selbst, wobei deren Aktivität der des natürlichen Proteins sehr nahe kommt. So können transgene Tiere, beispielsweise Schweine, Rinder usw. erhalten werden, die menschliches Insulin, Erythropoietin usw. produzieren, die in der Medizin dann besser genutzt werden
- 35 können.

Anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens kann ein einmal transgen gemachtes Nutztier mit beispielsweise den vorstehend aufgeführten Eigenschaften stabil fortgepflanzt werden.

So kann eine effiziente Gewinnung größerer Klongruppen transgener Tiere durch nachstehenden Verfahrensablauf wie folgt schematisch dargestellt werden:

1. Mikromanipulation von Zygoten

- 5 Dabei wird ein vorbereitetes Genkonstrukt (beispielsweise wie in der DE-OS-40 12 526 beschrieben) in eine befruchtete Eizelle eingeführt und integriert sich in das Genom. Dies stellt einen normalen Gentransfer mit einer additiven, zufälligen Integration des Genkonstrukts in das Genom der Zygote dar. Ebenfalls möglich ist die Durchführung einer homologen Rekombination, bei der gleichzeitig ein endogenes Gen ausgeschaltet  
10 oder ein endogener Promotor/ein endogenes Gen genutzt werden kann.

2. in vitro Kultur

- Die Zygote wird kurzfristig, d.h für 1 - 5 Std. oder für mehrere Tage, beispielsweise 1 bis 8 Tage, in einem geeigneten Medium gezüchtet. Sie kann auch sofort in den Eileiter eines  
15 geeigneten Empfängertiers transferiert werden.

3. Transfer auf Empfänger

- Die Zygote wird zur weiteren Entwicklung zu einem Embryo in den Eileiter oder den Uterus eines Empfängertier transferiert, wobei bis zu 4 Embryonen transferiert werden  
20 können

4. Gewinnung des Embryos bzw. Fetus

- Der Fetus wird isoliert, beispielsweise durch Schlachtung des Empfängertiers und Entnahme des Fetus. Andere Arten der Gewinnung des Embryos ohne Tötung des Empfängertiers sind ebenfalls möglich.  
25

5. Selektion auf transgene Föten

Zellen des Embryos werden gewonnen und auf Integration des Genkonstrukts untersucht.

- 30 6. Isolierung primordialer Keimzellen aus den Föten

Die primordialen Keimzellen aus Feten, die das Genkonstrukt integriert haben, werden gewonnen und weiterverwendet.

7. Klonierung

- 35 Die Kerne transgener, primordialer Keimzellen werden mit geeigneten Empfängerzellen zusammengebracht (Kerntransfer, Fusionierung) und wie hier näher erläutert behandelt.

## 8. in vitro Kultur

Die Zellen werden für einen Zeitraum von etwa 4 bis 10 Tagen in vitro gezüchtet.

## 9. Transfer auf Empfänger

- 5 Die sich bildenden Zellhaufen (Blastozysten) werden erneut auf Empfängertiere übertragen. Vor dem Transfer wird die Zona pelucida aufgeschlitzt, was sich als besonders geeignet erwiesen hat.

## 10. Wiederholen des Verfahrens von 6. bis 9.

10

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen geklonten Tiere, die, wie oben erläutert, transgen sein können oder nicht.

- 15 Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist neben einer gesteigerten Effizienz, d.h. einer gegenüber den Verfahren des Standes der Technik gesteigerten Erfolgsrate bei der Wiederherstellung genetisch gleicher Embryonen auch darin zu sehen, daß größere Klongruppen erhältlich sind. So kann ein bereits geklonter Fetus dazu verwendet werden weitere Klone zu erzeugen, da die fetalen Zellen wiedergewonnen und in vitro effizient weiterverwendet werden können (Punkt 10 des vorstehend aufgeführten Verfahrens).

20

- 20 So konnten unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens Ergebnisse erzielt werden, die sogar besser waren als jene, die aus punktierten Oozyten mit anschließender Reifung und Fertilisation - jedoch ohne Klonierung - entstanden sind. Die dabei beobachtete höhere in vivo Entwicklungskapazität erhöht die Effizienz der Klonierungsprogramme erheblich.

25

- 30 Als Maß für die Effizienz derartiger Verfahren kann die sogenannte Graviditätsrate (Trächtigkeitsrate) dienen, die als Anteil der nach Transfer von 6 - 7 Tagen in vitro kultivierten Embryonen auf synchronisierte Empfängertiere gravid gewordenen Tiere ermittelt werden kann. Die jeweiligen Graviditätsraten können durch Messung des Progesteronspiegels, Ultraschalluntersuchungen oder mittels rektaler Palpation bestimmt werden.

Dabei wurden für das Beispiel Rind mit unterschiedlichen Verfahren folgende Ergebnisse erhalten:

Graviditätsraten:

Oocytenpunktion mit anschließender IVM und IVF	34 %
Embryoklonierung (durchschnittlich)	25 %
Embryoklonierung mit primordialen Keimzellen	> 50 %

5

IVM = in vitro Maturation/Reifung

IVF = in vitro Fertilisation

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf das lediglich zur Erläuterung gegebene  
 10 Beispiel ausführlicher erläutert, das den Bereich der Erfindung nicht einschränken soll.

Beispiel**Isolierung primordialer Keimzellen beim Rinderfetus**

15

Feten aus Uteri von geschlachteten Kalbinnen oder Kühen wurden freipräpariert und in  
 PBS (Phosphate buffered Saline, ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , mit Penicillin/ Streptomycin, plus 10%  
 fetales Kälberserum (FCS)) auf Eiswasser ins Labor gebracht. Die Feten wurden anschlie-  
 ßend mehrmals mit frischem PBS gewaschen. Der Fetus wurde caudal der Vorder-  
 20 gliedmaßen jeweils quergeteilt, es erfolgte eine mediane Öffnung der Bauchwand und  
 Kranialverlagerung von Leber und Darmkonvolut. Anschließend wurden der nun frei-  
 liegende Mesonephros und die medial anliegenden Gonaden gewonnen und in frischem  
 PBS gewaschen. Die Gonaden wurden mittels Pinzetten abpräpariert und erneut in PBS  
 gewaschen. Dann wurden diese in 0,02%igem EDTA für 10 bis 20 Minuten inkubiert.  
 25 Eine Inkubation in 0,4%iger Protease (Sigma, P 6911) für 3-8 Minuten bei 37-39°C  
 erzielte die gleiche Wirkung.

Die Gonadenzellen wurden mittels einer Pipette in Kulturmedium mit zugesetzten  
 Wachstumsfaktoren (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (Gibco), ergänzt mit 15%  
 30 FCS, 2mM L-Glutamin,  $10^{-7}$  mMol  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 mMol nicht essentiellen  
 Aminosäuren, LIF (Leukemia Inhibitory Factor, 1000 Units/ml), bFGF (basic Fibroblast  
 Growth Factor, 10 ng/ml) und Penicillin/Streptomycin) umgesetzt wobei eine Zellkultur  
 erhalten wurde. Alternativ wurden die Gonaden mehrmals mit einer 30 G-Nadel (Gauge)  
 punktiert und die Zellen anschließend auf- und abpipettiert, bis eine Zellsuspension  
 35 vorlag. Die Zellen wurden sodann in einer Tischzentrifuge bei 1100 U/min (160 g) 4  
 Minuten vorsichtig abzentrifugiert und anschließend erneut in Kulturmedium  
 resuspendiert.

Die resuspendierten Zellen wurden sodann in 35 mm Petrischalen bei 37 bis 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Luft bis zur Verwendung gezüchtet.

5 Zur Isolierung der Zellen für die Klonierung wurde die Zellsuspension in eine 4 cm Zellschale überführt und für 20-22 Std. in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (Gibco) (supra), bei 37-39°C, 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. 15 Minuten vor Klonierungsbeginn wurden die Zellen kurz (1 - 2 Minuten) mit einer 0,1%igen Trypsinlösung (Sigma) behandelt, um sie vollständig in Suspension zu bringen.

10 Zur weiteren Selektion auf primordiale Keimzellen und deren Proliferation wurde die Kultur (enthaltend Keimzellen, Fibroblasten, Erythrozyten usw.) anschließend auf Feederzellen umgesetzt. Als Feederzellen konnten bovine Fibroblasten, nicht transfizierte STO-Zellen (ATCC CRL-1503) oder inaktivierte Gonadenanlagen erfolgreich eingesetzt werden. Das Kulturmedium war DMEM (Gibco, Nr. 074-2100A) (high Glucose), welches  
15 mit 15% FCS, 2 mMol nicht essentiellen Aminosäuren, 2 mMol L-Glutamin, 10<sup>-4</sup> β-Mercaptoethanol, Penicillin/Streptomycin, 1000 IU/ml LIF und 10 ng/ml bFGF ergänzt worden war.

Alternativ wurden die primordialen Keimzellen aus der Zellkultur unter Verwendung einer  
20 Pipette selektiv in eine neue Schale umgesetzt, wodurch die Anzahl an "Fremd"-Zellen minimiert werden konnte.

Die primordialen Keimzellen, die als Kernspender verwendet werden sollen, lassen sich in der Zellsuspension als große (15-25µm), gelblich aussehende, irregulär oder rund ge-  
25 formte Zellen mit großem Kern identifizieren, die manchmal "Blebbing"-Phänomene zeigen. Diese Zellen konnten gezielt gewonnen werden.

#### Additiver Gentransfer

30 In vitro rekombinierte Genkonstrukte, wie sie in der DE-OS-40 12 526 beschrieben sind, die hier unter Bezugnahme mit aufgenommen wird, werden durch konventionelle DNA-Mikroinjektion (Brem G., Transgenic Animals, Genetic Engineering of Animals, VCH Weinheim (1993), 83-170) in die Kerne isolierter primordialer Keimzellen oder durch bekannte Transformationsverfahren (Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory  
35 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) stabil integriert. Der Nachweis der Integration in den Zellen erfolgt mittels PCR und/oder Southern Blotting (Maniatis, vorstehend). Eine Expression in ausdifferenzierten Zellen zeigt, daß der Gentransfer erfolgreich gewesen ist.

### Klonierung

- 18-20 Std. nach dem Beginn der Reifung wurden aus dem Eierstock isolierte bovine Oozyten von den sie umgebenden Kumuluszellen befreit und innerhalb von zwei Stunden enukleiert (Molecular Reproduction and Development **42** (1995), 53-57). Ca. 20-22 Stunden nach Beginn der Reifung wurden wie vorstehend gewonnene primordiale Keimzellen mittels einer Transferpipette in den perivitellinen Raum von enukleierten Oozyten überführt und die sich dabei bildenden Karyoplast-Zytoplast-Komplexe (KZK) wurden jeweils für 10 µsek. einem doppelten elektrischen Puls von 2,1 kV/cm ausgesetzt, um die Fusion zu induzieren. Die KZKs wurden in Ham's F-12 Medium (Sigma) mit 10% FCS in einem Brutschrank gezüchtet. Die Fusion wurde 30 bis 60 Minuten nach dem Fusionspuls durch mikroskopische Untersuchung beurteilt.
- 24 Stunden nach Beginn der Reifung wurden die KZKs durch eine 5 minütige Inkubation in 7% Ethanol aktiviert und anschließend 5 Stunden in 10µg/ml Cycloheximid (Sigma C-7698) und 5 µg/ml Cytochalasin B (Sigma C-6762) gezüchtet. Anschließend wurden die KZKs in einem 100 µl Tropfen CR-1 Medium (Rosenkrans und First, 1991) mit 10% Östrus-Kuh-Serum umgesetzt. Die Tropfen wurden mit Paraffin-Öl überschichtet und für 7 bis 8 Tage bei 39°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre aus 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> gezüchtet.

Tabelle : Primordiale Keimzellen (PKZ) als Kernspender

	KZK	Fusionierte KZK (%)	Teilung (%)	Blastozysten (%)
PKZ Fetus 50-57 Tage	139	109 (74%)	77 (71%)	38 (35%)
PKZ Fetus 65-76 Tage	143	128 (90%)	81 (63%)	32 (25%)
PKZ Fetus 95-105 Tage	171	171 (87%)	90 (60%)	30 (20%)
Embryonale Blastomeren	111	108 (97%)	66 (61%)	3 (3%)

25

Wie aus vorstehender Tabelle ersichtlich, war es bereits bei dem ersten Versuch möglich, eine Teilungsrate von bis zu 71 % und eine Blastozystenrate von bis zu 35 % zu erhalten.



## Embryotransfer

### Empfängermanagement

- 5 Als Empfänger wurden Kalbinnen verwendet, die folgende Kriterien erfüllten:
1. Aufzucht in IBR (bovines Herpesvirus Typ 1) unverdächtigen Betrieben;
  2. serologische Untersuchung auf BHV-1-Antikörper (infektiöse bovine Rhinotracheitis / infektiöse pustulöse Vulvovaginitis) negativ;
  3. serologische Untersuchung auf BVD (bovine Virus Diarrhoe)/MD-Antigen (Mucosal  
10 Disease) negativ;
  4. dem Alter (13-16 Monate) entsprechende Körpermasseentwicklung;
  5. eingetretene Geschlechtsreife; bei Tieren, die den Embryo austragen sollen, eingetretene Zuchtreife;
  6. gynäkologische Untersuchung ohne pathologische Befunde;

15

Alle Empfänger erhielten unmittelbar nach Aufstallung Mineralstoffboli (All Trace, Ranching Consult GmbH), um die erfahrungsgemäß unzureichende Versorgung mit Selen, Kupfer und Cobalt auszugleichen (Wittkowski et al., Zur Selensupplementierung bei Färsen; Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer Deutschland (AET-d).  
20 13.06.-14.06.1996, Marktredwitz).

BVD-Antikörper negative Tiere wurden gegen BVD/MD immunisiert (Rumilis®, Intervet), um das Infektionsrisiko bei Übertragung von Embryonen (Mödl et al., Control of bovine viral diarrhoea virus in abattoir ovaries for in vitro fertilization (IVF) or cloning  
25 programs. 11e Reunion A.E.T.E.-Hannover, 8-9 September 1995) bzw. nach Verbringen in Ställen mit unbekanntem BVD-Status zu minimieren. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit Grassilage, Heu und Stroh. Entwurmungen wurden im Frühjahr und Herbst mit Ivermectin (Ivomec®, MSD Agvet) durchgeführt. Die Unterbringung der Empfänger erfolgt zum Teil in Laufstall- (Offenstall, Gruppengröße 6 Tiere) und zum Teil in Anbindehaltung.  
30

### Empfängervorbereitung

Die Übertragung der in vitro hergestellten Embryonen erfolgte auf Zyklus-synchrone Empfänger, d.h. das Stadium des Sexualzyklus entspricht dem Alter des zu übertragenden Embryos. Dabei wird der Tag der Brunst als Zyklustag 0 bezeichnet. Die Brunst-synchronisation erfolgte im Diöstrus durch die einmalige intramuskuläre Applikation eines Prostaglandin F<sub>2</sub>- $\alpha$ -Analogons (2,0 ml Estrumate®, Mallinckrodt Veterinary). Kalbinnen,  
35

bei denen mittels rektaler Palpation kein funktionelles Corpus luteum diagnostizierbar war, wurden nicht für die Brunstsynchronisation verwendet. Die Brunst tritt erfahrungsgemäß 2-3 Tage post applicationem ein und wird anhand des Brunstverhaltens und des Scheidenbefundes beurteilt.

5

#### Embryotransfer

Die in vitro produzierten Embryonen wurden nach 7-tägiger Kultur auf geeignete Empfänger transferiert. Dazu wurden die Embryonen identifiziert, qualitativ beurteilt, 10 Zona geschlitzt, in ein geeignetes Transfermedium umgesetzt und anschließend in Minipailletten (Minitüb) aufgezogen. Als Transfermedien wurden PBS + 10% fetales Kälberserum (FCS, Biochrom), Ovum Culture Medium (ICP, Neuseeland) + 10% FCS oder TL-Hepes + 10% FCS verwendet.

15 Die verschlossenen Pailletten wurden bis zum Transfer, der innerhalb von ca. 90 Minuten stattfinden sollte, bei 37,8°C in einem Miniinkubator gelagert.

Die Eignung der Empfänger wurde anhand folgender Kriterien beurteilt:

20 Die Tiere wurden etwa 7 Tage vor dem Transfer in Brunst beobachtet, wobei die Asynchronität 24 Std. nicht überschreiten soll (Hasler et al., *Theriogenology* **43** (1995), 141-152). Das Vorhandensein und die Größe eines funktionellen Gelbkörpers wurde entsprechend bewertet (Assey et al., *Theriogenology* **39** (1993), 1321-1330).

25 Die verwendeten Tiere wiesen keine Anzeichen einer Erkrankung des Genitaltraktes auf.

Nach der Auswahl wurde eine Epiduralanästhesie (2,0 ml Lidocain®, Albrecht) vorgenommen und das äußere Genitale sorgfältig mit trockenem Papier gereinigt. Anschließend wurde der körperwarme Transferkatheter (Minitüb) mit einer Paillette beschickt und mit 30 einer Plastikschtzhülle (Sanisheath, Minitüb) versehen. Der Transfer erfolgte unblutig unter rektaler Kontrolle der Cervixpassage und der Katheterposition in die Spitze des ipsilateralen Uterushornes (Reichenbach et al., *J. Reprod. Fertil.* **95** (1992), 363-370). Dabei wurde die Plastikschtzhülle erst am äußeren Muttermund mit dem Transferkatheter perforiert, um eine Keimverschleppung aus der Vagina in den Uterus zu vermeiden. War 35 der Transfer mehrerer Embryonen auf einen Empfänger vorgesehen, so wurden diese bilateral abgesetzt. Dazu wurde der Transferkatheter bis in das Corpus uteri zurückgezogen, der Mandrin mit der entleerten Paillette entfernt, eine neue Paillette mit Embryo(nen) in den Katheter geschoben und im contralateralen Uterushorn positioniert.

Unmittelbar nach dem Transfer wurden alle relevanten Daten (Lebensnummer des Empfängers, Herkunft, Anzahl und Qualität der Embryonen usw.) dokumentiert.

#### Trächtigkeitsuntersuchung

5

21 Tage nach der Brunst, also 14 Tage nach dem Embryotransfer, wurde eine Brunstkontrolle vorgenommen und der Progesteron Gehalt im Blutserum festgestellt. Werte unter 0,1 ng/ml werden als sicher nicht trächtig angesehen. Bei Progesteronwerten über 2,0 ng/ml kann mit einer Trächtigkeit gerechnet werden. Die erste direkte Trächtigkeitsuntersuchung wurde um den 35. Tag mittels Ultraschall und die zweite manuell um den 42. Trächtigkeitstag vorgenommen.

10

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung eines tierischen Embryos, das die folgenden Schritte umfaßt:
- (a) Gewinnen einer primordialen Keimzelle
  - (b) Vereinen des Kerns der primordialen Keimzelle mit einer geeigneten Empfängerzelle,
  - (c) Züchten der so erhaltenen Zelle für einen Zeitraum, damit sich eine Blastozyste bildet,
  - 10 und gegebenenfalls
  - (d) Einbringen des gewachsenen Zellhaufens in ein Muttertier.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die geeignete Empfängerzelle eine enukleierte Eizelle ist.
- 15 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die primordiale Keimzelle mit der geeigneten Empfängerzelle fusioniert wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die in Schritt (a) eingesetzte
- 20 primordiale Keimzelle von den in Schritt (d) gewonnenen Zellen abgeleitet ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die primordialen Keimzellen von Tieren abgeleitet sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ungulaten, Kaninchen, Nagern, oder Vögel.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Tiere Ungulaten sind.
7. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem das Tier ein Rind ist.
- 30 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die primordiale Keimzelle transgen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die primordiale Keimzelle ein pharmazeutisch oder ernährungsphysiologisch interessantes Gen enthält.
- 35 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, bei dem das Genprodukt des eingebrachten Gens in die Milch sezerniert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem das Transgen Chymosin oder Trypsin ist.
  12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, bei dem das Transgen unter der Kontrolle eines endogenen Promotors liegt.
- 5
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, bei dem das Transgen oder ein endogenes Gen unter der Kontrolle eines exogenen Fremdpromotors oder eines Spezies-endogenen Promotors liegt.
- 10
14. Tiere, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/00229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A01K67/027 C12N5/06 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A01K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 774 510 A (MEIJI MILK PRODUCTS CO. LTD) 21 May 1997 See the whole document, in particular page 7, line 41 - page 8, line 58	1, 2, 5, 6, 8
X	WO 97 25412 A (THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17 July 1997 see page 6, line 27 - page 7, line 12 see page 33, line 27 - page 36, line 3	1, 2, 4-10, 14
X	WO 95 10599 A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 20 April 1995 see the whole document --- -/-	1-9, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 1998

Date of mailing of the international search report

27/10/1998

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

De Kok, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/EP 98/00229

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DELHAISE F ET AL.: "Nuclear transplantation using bovine primordial germ cells from male fetuses" REPRODUCTION FERTILITY AND DEVELOPMENT, vol. 7, no. 5, 1995, pages 1217-1219, XP002079413 EAST MELBOURNE AU see the whole document	1-3,5-7
A	BREM G ET AL: "MAMMARY GLAND SPECIFIC EXPRESSION OF CHYMOSIN CONSTRUCTS IN TRANSGENIC RABBITS" THERIOGENOLOGY, vol. 43, no. 1, January 1995, page 175 XP002070795 see the whole document	1,11
A	EP 0 451 823 A (CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE) 16 October 1991 cited in the application see the whole document	1,8-14
A	WO 97 07668 A (ROSLIN INSTITUTE EDINBURGH) 6 March 1997 cited in the application see the whole document	1-8,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/00229

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0774510	A	21-05-1997	AU 2682895 A CA 2192982 A WO 9534636 A	05-01-1996 21-12-1995 21-12-1995
WO 9725412	A	17-07-1997	WO 9725413 A AU 1570697 A AU 4353696 A	17-07-1997 01-08-1997 01-08-1997
WO 9510599	A	20-04-1995	AU 7934594 A	04-05-1995
EP 0451823	A	16-10-1991	DE 4012526 A AU 7423391 A CA 2040178 A JP 4365487 A	14-11-1991 17-10-1991 12-10-1991 17-12-1992
WO 9707668	A	06-03-1997	AU 6830996 A EP 0847237 A GB 2318792 A NO 980846 A PL 325336 A	19-03-1997 17-06-1998 06-05-1998 29-04-1998 20-07-1998



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern .ales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00229

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A01K67/027 C12N5/06 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A01K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	EP 0 774 510 A (MEIJI MILK PRODUCTS CO LTD) 21. Mai 1997 siehe das ganze Dokument, insbesondere Seite 7, Zeile 41 - Seite 8, Zeile 58 ---	1,2,5,6, 8
X	WO 97 25412 A (THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17. Juli 1997 siehe Seite 6, Zeile 27 - Seite 7, Zeile 12 siehe Seite 33, Zeile 27 - Seite 36, Zeile 3 ---	1,2, 4-10,14
X	WO 95 10599 A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 20. April 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-9,14

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/10/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 98/00229

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DELHAISE F ET AL.: "Nuclear transplantation using bovine primordial germ cells from male fetuses" REPRODUCTION FERTILITY AND DEVELOPMENT, Bd. 7, Nr. 5, 1995, Seiten 1217-1219, XP002079413 EAST MELBOURNE AU siehe das ganze Dokument ----	1-3,5-7
A	BREM G ET AL: "MAMMARY GLAND SPECIFIC EXPRESSION OF CHYMOSIN CONSTRUCTS IN TRANSGENIC RABBITS" THERIOGENOLOGY, Bd. 43, Nr. 1, Januar 1995, Seite 175 XP002070795 siehe das ganze Dokument ----	1,11
A	EP 0 451 823 A (CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE) 16. Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1,8-14
A	WO 97 07668 A (ROSLIN INSTITUTE EDINBURGH) 6. März 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-8,14

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00229

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0774510 A	21-05-1997	AU 2682895 A CA 2192982 A WO 9534636 A	05-01-1996 21-12-1995 21-12-1995
WO 9725412 A	17-07-1997	WO 9725413 A AU 1570697 A AU 4353696 A	17-07-1997 01-08-1997 01-08-1997
WO 9510599 A	20-04-1995	AU 7934594 A	04-05-1995
EP 0451823 A	16-10-1991	DE 4012526 A AU 7423391 A CA 2040178 A JP 4365487 A	14-11-1991 17-10-1991 12-10-1991 17-12-1992
WO 9707668 A	06-03-1997	AU 6830996 A EP 0847237 A GB 2318792 A NO 980846 A PL 325336 A	19-03-1997 17-06-1998 06-05-1998 29-04-1998 20-07-1998

